

Untersuchungen über die Beschleunigung
der Phosphorylierung der Fruktose in der
Rattenleber durch Vitamin B 12 mittels
der Bestimmung der ATP-Konzentrationen

Roland Widmer

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. W. Seitz

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BESCHLEUNIGUNG DER PHOSPHORYLIERUNG
DER FRUKTOSE IN DER RATTENLEBER DURCH VITAMIN B 12 MITTELS
DER BESTIMMUNG DER ATP - KONZENTRATIONEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Roland Widmer
aus München



München 1959

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Dozent Dr. N. Z ö l l n e r

Korreferent: Professor Dr. W. S e i t z

Dekan: Professor Dr. K. K o l l e

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 1959

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung	1
2. Fruktoseabbau nach Leuthardt	2
3. Allgemeines über B - Vitamine	2
4. Vitamin B ₁₂	3
5. Die Versuche von Chiun und Chow	3
6. Eigene Versuche	7
7. Versuchsanordnung	8
8. ATP-Bestimmung nach Lamprecht	8
9. Optischer Test	9
10. 1. Versuchsreihe	10
11. Besprechung der 1. Versuchsreihe	14
12. 2. Versuchsreihe	14
13. Besprechung der 2. Versuchsreihe	17
14. 3. Versuchsreihe	17
15. Besprechung der 3. Versuchsreihe	20
16. 4. Versuchsreihe	20
17. Besprechung der 4. Versuchsreihe	23
18. 5. Versuchsreihe	23
19. Besprechung der 5. Versuchsreihe	26
20. Anhang	27
21. Zusammenfassung	29
22. Literaturverzeichnis	31

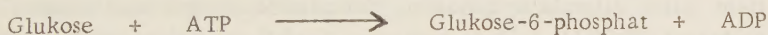


Digitized by the Internet Archive
in 2026

Von den Zuckern der menschlichen Nahrung ist Glukose mengenmäßig am stärksten vertreten. Aber auch Fruktose und Galaktose werden aufgenommen. Im Blut ist Fruktose nur in geringen Mengen vorhanden. Versuche von CHERNICK und CHAIKOFF aus dem Jahre 1951 zeigen, daß nach Infusion von 1 g Glukose/kg Körpergewicht/Stunde bei normalen Versuchspersonen der durchschnittliche Maximalanstieg von Glukose bei 215 mg% über dem Ausgangswert lag. Unter Fruktose kam es bei den gleichen Versuchspersonen jedoch nur zu Werten im Bereich von 77 mg%, d.h. weniger als der Hälfte, die man bei vergleichbaren Glukosemengen erreicht. Die Fruktose verhält sich im Stoffwechsel in mancher Beziehung anders als die Glukose. Die Abweichungen erklären sich daraus, daß Fruktose fast ausschließlich und mit großer Geschwindigkeit in der Leber abgebaut wird. Zahlreiche Untersuchungen haben dies bewiesen (JOHANNSEN, CRAIG, HELMREICH). Bei Fruktosezusatz zeigt sich eine starke Steigerung des Einbaues von Glukose in das Glykogen. Dabei ist interessant, daß nach Fruktosebelastung der Gesamtzucker nur wenig ansteigt, aber der Glukosespiegel vorübergehend stark absinkt (STUHLFAUTH). Wahrscheinlich wird durch die Fruktose die Glykogenolyse verzögert.

Ein wichtiger Unterschied zwischen Glukose und Fruktose ist deren Verhalten im diabetischen Stoffwechsel. Schon KÜLZ (1874) hat beobachtet, daß Zuckerkranken Fruktose zugeführt werden kann, ohne daß der Harnzucker ansteigt. CHERNICK und CHAIKOFF (1951) haben gezeigt, daß die Oxydation der Fruktose im diabetischen Organismus unverändert ist.

Früher glaubte man, daß die Hexokinase nach der Gleichung

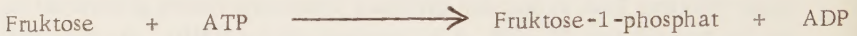


auch die Fruktose phosphoryliert. Dabei soll der vielfach in der Literatur zu findende Unterschied in der Glukose- und Fruktosephosphorylierung durch Gewebsschnitte, -brei und -extrakte auf verschiedene ATP Konzentrationen zurückzuführen sein. Das Enzym, das im Gewebe die Konzentration von ATP niedrig hält, die AT-phosphatase, ist ziemlich fest an die intakte Zellstruktur gebunden und fehlt weitgehend in Extrakten. Bei niedrigem Gehalt an ATP ist die Affinität der Glukose zum Enzym höher als die der Fruktose. Bei hohem Gehalt z. B. in Extrakten, werden beide Zucker gleich gut umgesetzt (MEYERHOF).

Wie schon erwähnt glaubte man also, daß das erste Phosphorylierungsprodukt der Fruktose durch die Hexokinase das Fruktose-6-phosphat sei. Die obigen Ausführungen beim Diabetes wären damit aber schlecht in Übereinstimmung

zu bringen. Wohl wird dieser Weg von der Fruktose teilweise gegangen, aber seit den Untersuchungen von CORI und SLEIN weiß man, daß noch ein spezifisches Ferment in der Leber vorhanden ist, das nur die Fruktose phosphoryliert. Dabei tritt als erstes Zwischenprodukt Fruktose-1-phosphat auf. Das konnten LEUTHARDT und TESTA 1951 endgültig beweisen.

Danach kann man die Phosphorylierung der Fruktose folgendermaßen formulieren:



Das Vorhandensein eines spezifischen auf die Fruktose eingestellten Fermentes in der Leber erklärt die rasche Assimilation des Zuckers durch das Organ. Die hohe Phosphorylierungsgeschwindigkeit muß wenigstens für kurze Zeit zu einer Senkung des Phosphats in der Leber führen. Der weitere Abbau der primären Phosphorylierungsprodukte liefert dann Phosphotriosen, deren Oxydation eine gesteigerte ATP-Synthese zur Folge hat. LAMPRECHT konnte nach Fruktosebelastung eine starke Erhöhung der ATP-Konzentration in der Leber nachweisen.

Vorerst soll aber einiges Allgemeines über die Wirkung von B-Vitaminen auf den Kohlehydratstoffwechsel angeführt werden.

Vitamin B₁ greift in den Kohlehydratstoffwechsel ein, indem es die Verbrennung der Brenztraubensäure katalysiert (PREISLER). Als Aneurindiphosphat ist es das Coenzym der Carboxylase. Diese Cocarboxylase wird im Gewebe durch ein besonderes Enzym aus Aneurin und ATP aufgebaut (OCHOA). Bei Vitamin-B₁-Mangel ist Brenztraubensäure im Blut und besonders im Gehirn stark vermehrt (PETERS). Bei Alloxandiabetischen Ratten wird der respiratorische Quotient durch Vitamin B₁ gehoben. Trotz Insulinmangel wird wieder Kohlehydrat verbrannt (BRADA). In dem anaeroben Zerfall der Kohlehydrate in Milchsäure und deren Überführung in CO₂ wirken die Codehydrogenasen I und II mit. Sie sind Derivate der Nicotinsäure². Die weite Verbreitung der B-Vitamine zeigt die große Bedeutung dieser Stoffe für den Ablauf der Lebensprozesse. Sicher sind verschiedene B-Faktoren Bestandteile von Cofermenten, andere wiederum sind auf Grund spezifischer Wirkungen an katalysatorischen Vorgängen beteiligt.

Alle B-Faktoren sind essentielle Metaboliten. Sie stellen also spezifische, für den Ablauf der Stoffwechselvorgänge unentbehrliche Faktoren dar.

Vitamin B₁₂

MINOT und MURPHY entdeckten 1926, daß die Leber hämopoetische Wirkstoffe enthält. 1947 hat man in der Folsäure diesen Wirkstoff gefunden. Im Jahre 1948 veröffentlichten englische Forscher (SMITH und Mitarbeiter) ihre Ergebnisse über die Auffindung einer kristallisierten roten Substanz, die sie Vitamin B₁₂ nannten. Mangel an diesem Vitamin scheint die Ursache der perniziösen Anämie zu sein, auch scheint es einen fördernden Einfluß auf das Wachstum aller bisher untersuchten Tierarten auszuüben (z. B. ZINK, GARTWRIGHT).

Vitamin B₁₂ ist wohl der aktivste biologische Stoff, den wir kennen. Es kann allerdings seine Wirkung nur bei Anwesenheit von Folsäure voll entfalten. Beide sind für den Organismus unerläßlich und können sich nur bei kombinierten Mangelzuständen vertreten.

Die Funktion des Vitamin B₁₂ im Stoffwechsel wurde durch Versuche an Mikroorganismen und höheren Tieren aufgeklärt. Dabei hat sich gezeigt, daß bei *Lactobacillus lactis* und *Leichmannii* Vitamin B₁₂ durch das Pyridinnucleotid Thymin, sowie durch die Desoxyribonucleoside des Adenins, Guanins, Hypoxanthins und Cytosins ersetzt werden kann. Es ist daher wahrscheinlich, daß Vitamin B₁₂ für den Abbau gewisser Purine und Pyrimidine unentbehrlich ist und daß durch den Ausfall dieser Nucleinsäurebausteine die Entwicklungshemmung bei Vitamin-B₁₂-Mangel zu erklären ist. Bei manchen Colistämmen kann Vitamin B₁₂ auch durch Methionin ersetzt werden, was auf eine Beziehung zur Synthese dieser Aminosäure hinweist. Viele Untersuchungen deuten auch darauf hin, daß Vitamin B₁₂ am Stoffwechsel der C₁-Fragmente beteiligt ist, wahrscheinlich durch Bildung labiler Methylgruppen.

CHIUN und CHOW haben 1954 über eine Versuchsreihe berichtet, die den Einfluß von Vitamin B₁₂ auf den Kohlehydrat- und Fettstoffwechsel zeigt. Die Autoren haben schon früher Untersuchungen durchgeführt, die ergaben, daß Vitamin B₁₂ Veränderungen im Kohlehydrat- und Fettstoffwechsel und eine bemerkenswerte Verminderung der Glutathionkonzentration im Blut verursacht. Sie beschrieben außerdem weitere Untersuchungen (siehe unten) über den Effekt von Vitamin B₁₂ auf Kohlehydrat- und Fettstoffwechsel und eine mögliche Beziehung zwischen diesen Veränderungen und der Glutathionkonzentration im Blut und Gewebe. Hohe Kohlehydrat- und niedrige Fettgaben beschleunigen den Mangel an Vitamin B₁₂.

Sie stellen folgende Hypothese auf:

Die Veränderungen im Kohlehydrat- und Fettstoffwechsel und die Verminderung

der Blutglutathionkonzentration beruhen auf Vitamin B_{12} -Mangel. Da viele Enzyme, die im Kohlehydratstoffwechsel wirksam sind, Sulphydrienzyme darstellen, ist es möglich, daß eine Beziehung zwischen den Veränderungen des Kohlehydratstoffwechsels und der Glutathionkonzentration besteht. Wenn Vitamin B_{12} für den Kohlehydratabbau gebraucht wird, ebenso wie zur Bildung von Glutathion im Körper, dann würde eine vermehrte Kohlehydratverwertung einen Mangel an Vitamin im Gewebe ergeben. Das zeigt sich möglicherweise in einer Veränderung des Blutzuckerspiegels und im Gehalt an Glutathion.

Es sollen nun Versuche der Autoren angeführt werden, die den Einfluß von Vitamin B_{12} auf den Glukosespiegel des Blutes zeigen. Die Versuchstiere waren B_{12} -Mangel-Ratten, denen nach 48-stündigem Nahrungsentzug 750 mg/kg Körpergewicht Glukose intravenös verabreicht wurden. Der Blutzuckerspiegel erhöhte sich dabei stark; wurde jedoch Vitamin B_{12} dazu gegeben, dann stieg der Blutzucker nicht wesentlich an (1 Gamma/Tag s. c.).

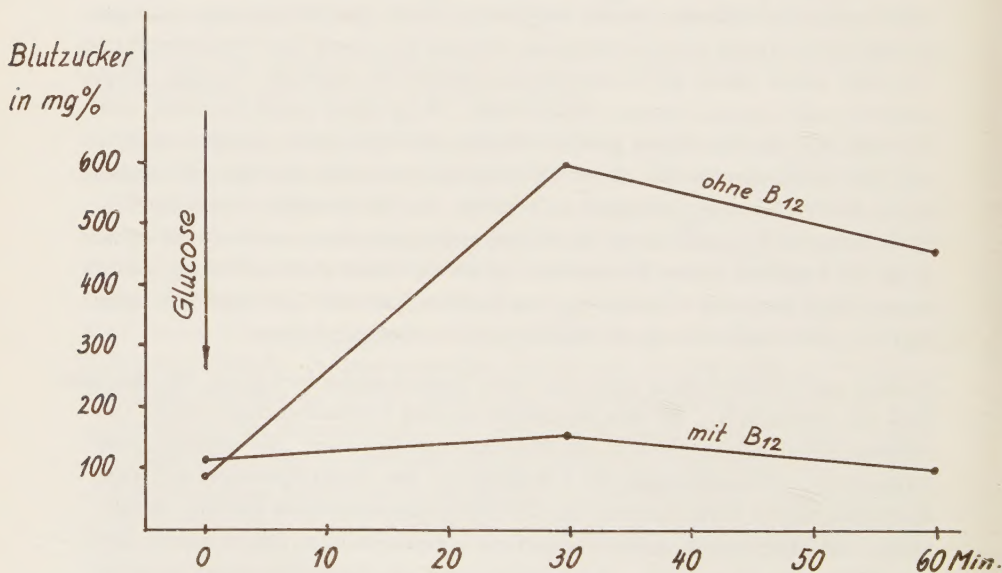


Abb. 1

Der Einfluß von Vitamin B_{12} auf den Glucosespiegel des Blutes.

Weiter wurden bei hohen Glukosegaben Blutzucker- und Glutathionspiegel bestimmt:

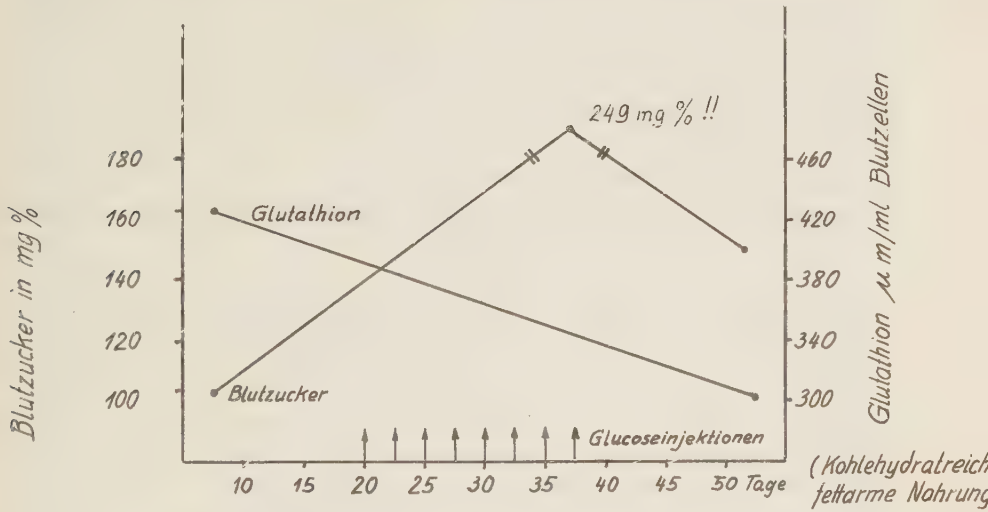


Abb. 2 *Blutzucker und Glutathionspiegel bei großen Kohlehydratgaben.

Folgende Kurve zeigt noch den Effekt von Vitamin B₁₂ auf induzierte Hyperglykämie. Dabei wurde den Tieren zuerst 25%ige Glukose injiziert (Pfeile) und dann einem Teil der Tiere Vitamin B₁₂ in der schon oben angegebenen Menge.

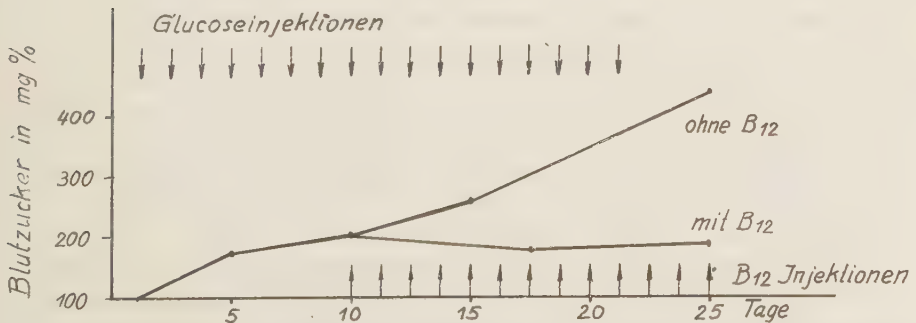


Abb. 3 Der Effekt von Vitamin B₁₂ auf induzierte Hyperglykämie.

Die hohen Blutzuckerwerte bei Vitamin B₁₂-Mangel zeigen, daß den Tieren die Möglichkeit fehlt, große Kohlehydratmengen zu verwerten. Daneben tritt bei den Mangeltieren bei verminderter Fettfütterung ein bedeutender Gewichtsverlust auf. Dieser zeigt, daß diese die Möglichkeit, Kohlehydrate in Fette zu verwandeln, verloren haben. Damit im Einklang steht die Beobachtung, daß bei Mangeltieren und bei Menschen mit perniziöser Anämie abnorm geringe Mengen von Phospholipoiden gefunden werden. Obwohl der Mechanismus, den Vitamin B₁₂ bei der Verwertung der Kohlehydrate spielt, noch unbekannt ist, ist es doch denkbar, daß eine entsprechende Glutathionkonzentration im Blut einer der vielen Gründe in der Wirkung dieses Vitamins ist.

CHOW selbst schreibt folgendes über seine Beobachtungen: "Es gibt viele Erklärungen, inwiefern Glutathion die Kohlehydratverwertung beeinflusst, so z.B. die Aktivierung der Sulfhydrylenzyme und der Schutz der B-Zellen des Pankreas vor den deletären Einflüssen bestimmter Stoffwechselprodukte wie Alloxan und Dehydroascorbinsäure. Obwohl diese Substanzen gewöhnlich nur in geringen Mengen im Körper gefunden werden, so kann sich doch ihre Konzentration unter bestimmten Umständen bedeutend erhöhen. So fand man z.B., daß Dehydroascorbinsäure in bemerkenswerten Mengen in skorbutischen Geweben von Guinea-schweinen vorhanden war, und daß die Glutathionmenge bedeutend verringert war, besonders im Pankreas. Auch die Geschwindigkeit, mit der Glutathion nach Injektion den Blutzucker senkt, deutet darauf hin, daß diese Substanz direkt mit der Kohlehydratverwertung in Beziehung steht. Diese Annahme wird bestärkt durch Beobachtungen von CAVALLINI über die Rolle von Glutathion bei der oxydativen Decarboxylierung des Pyruvats, und solchen von RACKER über den Mechanismus der Glyoxalasewirkung und durch die Entdeckung von KRIMSKY und RACKER, daß Glutathion die prosthetische Gruppe der 3-phospho-glyceraldehyd-dehydrogenase ist. JACOWITZ berichtet, daß Vitamin B₁₂ den Pantothen säure einsparmechanismus, der für das Wachstum von Hühnern wichtig ist, verstärkt und daß dieses Vitamin anscheinend die Umwandlung von Pantothen säure in Coenzym A in der Leber steigert. Dieser Befund macht eine Beziehung zwischen Vitamin B₁₂ und anderen Sulfhydrylverbindungen, Coenzym A, wahrscheinlich. Da Coenzym A eine wichtige Rolle spielt bei der Bildung von Fettsäuren, Phospholipoiden, Cholesterin und Acetylcholin, ist es weiter möglich, daß Vitamin B₁₂ auch eine wichtige Rolle bei der Fettbildung und im Cholinstoffwechsel spielt.¹²"

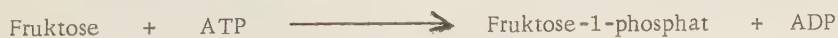
STUHLFAUTH hat 1951 gezeigt, daß Vitamin B₁₂ in der Lage ist, Fruktosebelastungskurven abzuflachen. Wird einer Versuchsperson Fruktose intravenös verabreicht, nachdem vorher in einem Abstand von 2 Stunden Vitamin B₁₂ gespritzt wird, so bleibt der Fruktoseblutspiegel bedeutend niedriger als ohne Vi-

itamin B₁₂. Da die erste Stufe des Fruktoseabbaus in einer Phosphorylierung zum Fruktose-1-phosphat durch Fruktohexokinase besteht, lag es nahe, daß, wie ZÖLLNER vermutete, die Erklärung für die überraschende Wirkung des Vitamins in einer Steigerung der Fruktokinaseaktivität zu suchen ist. VOGTMANN führte seine weiteren Untersuchungen an Leberhomogenaten durch, da die Leber als Ort dieser Aktivitätssteigerung in Betracht kam, nachdem MANN gezeigt hatte, daß das leberlose Tier nur in sehr geringem Maße in der Lage ist, Fruktose zu verwerten. Aus dem stöchiometrischen Vergleich zwischen der verschwundenen Fruktosemenge und dem zugesetzten ATP schlossen die Untersucher auf eine vermehrte Fruktokinaseaktivität beim Vitamin B₁₂-Effekt. Ähnliche Versuche wurden dann von ERNST durchgeführt, die wieder die Ergebnisse der Voruntersucher bestätigten, dabei aber noch zusätzlich Cobalt und Folsäure auf ihre diesbezügliche Wirkungsweise prüften. Letztere gaben aber den Vitamin B₁₂-Effekt nicht.

Eigene Versuche

Im Rahmen der Arbeiten von Prof. Stuhlfauth und Dr. Zöllner habe ich nun speziell die Änderung der ATP-Konzentration im Leberhomogenat nach Injektion von Vitamin B₁₂ zu untersuchen.

Da die Phosphorylierung der Fruktose von LEUTHARDT in folgender Weise formuliert wird



muß sich ein abhängiger Verlauf der ATP-Konzentration von der Fruktosekonzentration zeigen.

Als Versuchsanordnung diente die von ERNST verwendete, deren Grundlagen von LEUTHARDT und TESTA angegeben wurden.

Die Versuchstiere waren männliche Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von ca. 200 Gramm. Dem jeweiligen Versuchstier entzog man mindestens 18 Stunden vor dem Versuch die Nahrung. 2 1/2 Stunden vor Versuchsbeginn wurden 15 Gamma Vitamin B₁₂ (1 Ampulle Cytobion) intramuskulär gespritzt. Das scheint von besonderer Bedeutung, da bei anderer Applikation der Effekt nicht nachzuweisen ist, oder erst viel später eintritt. 2 1/2 Stunden nach der Injektion wurde die Ratte dekapitiert, die Leber möglichst schnell entnommen, diese kurz in Eiswasser gespült, auf Filterpapier getrocknet, gewogen

und im Verhältnis 1 : 1 mit isotoner KCL-Lösung im Eiswasser im Warring-blendor homogenisiert, und anschließend das Homogenat bei hoher Umdrehungszahl (ca. 15000 U/Min) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in einen vorgekühlten Meßzylinder gegossen und dieser wiederum in Eiswasser gestellt.

Die Versuchsanordnung in den einzelnen Reagenzgläsern war folgende:

In jedes Reagenzglas wurden

- 1,0 ccm Kaliumchloridextrakt einer Rattenleber,
- 0,4 " 0,04 m Magnesiumchloridlösung,
- 0,6 " 0,10 m Natriumbikarbonatlösung,
- 0,075 " 0,10 m Natriumbikarbonatlösung,
- 0,075 " 1,80 m Natriumfluoridlösung,
- 0,1 " 5 %iger Fruktoselösung,
- 1,0 " 0,5 %iger ATP-Lösung

pipettiert.

Die ATP-Lösung wurde immer zuletzt dazu gegeben. Dann wurden die Reagenzgläser in einem Wasserbad von 27 Grad C inkubiert. Nach 2, 4, 6, 8, 10, 15 Minuten wurde der Inhalt je eines Reagenzgläschens mit 0,36 ccm einer 60 %igen HClO_4 -Lösung enteiweißt.

Darauf sofort wieder in Eiswasser gestellt. Der Nullwert wurde natürlich nicht inkubiert, sondern sofort nach Zugabe der ATP-Lösung enteiweißt. Die enteiweißten Lösungen mußten nun nochmals in Kälte zentrifugiert werden. Dadurch erhielt man einen klaren Überstand, der unter kräftigem Rühren mit ca. 1,3 ccm einer 2n KOH-Lösung auf ein pH von 7,0 gebracht wurde. Nun wurde dieser neutralisierte Überstand 10 bis 15 Minuten in Eis gestellt, bis sich der gesamte Niederschlag abgesetzt hatte. Dann wurde abdekantiert und die Lösung weiterhin in Eis belassen. Dieser Überstand wurde nun zum optischen Test verwendet.

Die angewandte ATP-Bestimmung wurde von W. LAMPRECHT ausgearbeitet. Das Prinzip der Reaktion beschrieben O. WARBURG und A. KRONBERG.

ATP phosphoryliert Glukose unter dem katalytischen Einfluß der Hexokinase (HK) zu Glukose-6-phosphat und Bildung von ADP. Das entstandene Glukose-6-phosphat wird mit TPN und dem Warburg'schen Zwischenferment (ZF) zu 6-phosphoglukonsäure und TPN-H dehydriert.



Es entspricht also das gebildete TPN-H dem zugesetzten ATP.

Die reduzierte Form der Pyridincofermente ist durch eine charakteristische Absorptionsbande im Ultraviolettlicht bei 340 nm ausgezeichnet. Dank dieser Eigenschaft ist es möglich, Reaktionen, an denen Codehydrase I oder II beteiligt ist, optisch zu verfolgen. Die durch das gebildete TPN-H verursachte Extinktionsdifferenz kann zur Berechnung der zugesetzten ATP-Menge verwendet werden.

Lösungen zur ATP-Bestimmung

- 1) TPN: 10 mg TPN in 5,0 ml Aqua bidest.
- 2) Hexokinase: 15 mg Ferment in 1,0 ml Aqua bidest.
- 3) Zwischenferment: Suspension des Fermentes in 2,0 m-Ammoniumsulfat.
- 4) Glukose: 0,5 m-Lösung.
- 5) Magnesiumchlorid: 0,1 m-Lösung.
- 6) TRIS-Puffer: 0,02 m, pH = 7,4.

Optischer Test

Küvette d = 2 cm, Gerät "Eppendorf", Wellenlänge nm = 334.

In die Küvette werden nacheinander pipettiert:

- 0,1 ml neutraler Überstand
- 4,0 ml TRIS-Puffer
- 0,2 ml Magnesiumchloridlösung
- 0,4 ml Glukoselösung
- 0,05 ml TPN-Lösung
- 0,05 ml Hexokinaselösung

Start: 0,05 ml Zwischenfermentlösung

Die Fermentreaktion ist in 10 bis 12 Minuten abgelaufen. Beim Start des optischen Testes mit Zwischenferment ergibt sich nach Zugabe des Fermentes ein sogenannter "Fermentsprung". Dieser Wert muß natürlich vom Endwert abgezogen werden. Als Fermenteinheit E des Zwischenferments wird festgelegt: Eine Enzym-Einheit E ist die Menge, die bei 25 Grad C die TPN-H-Extinktion bei 334 nm in 100 Sekunden um 0,100 (= 100 E/1000) ändert, bezogen auf 1,0 ml und die 10 mm Küvette.

Die Berechnung des ATP-Gehalts ist nach folgender Formel möglich (gültig bei 334 nm):

$$\frac{\Delta E \cdot \text{Mol.gew.} \cdot \text{Vol}_{\text{küv}}}{6,13.1000 \cdot d \cdot \text{Vol}_{\text{test}}} = \text{Gamma/ml Aufschluß}$$

$$\Delta E \cdot f = \text{Gamma/ml}$$

d = Schichtdicke der Küvette

Vol_{küv} = Gesamtvolumen in der Küvette

Vol_{test} = Pro Küvette eingesetzte ATP-Testlösung (Überstand)

ΔE = Abgelesene Extinktionsdifferenz in E/1000

$6,13.10^{-6}$ = Molekularer Extinktionskoeffizient

Die ATP-Menge ist, wie aus obiger Gleichung ersichtlich ist, proportional der Extinktion ΔE .

1. Versuchsreihe

In dieser Versuchsreihe wurde das Leberhomogenat sowohl mit ATP-Lösung als auch mit Fruktose inkubiert (Vollversuch). Den Vitamintieren wurden 2 1/2 Stunden vor Entnahme der Leber 15 Gamma Vitamin B₁₂ gespritzt. Als Vergleich dienten die Kontrolltiere, denen kein Vitamin B₁₂ gegeben wurde.

Mit ATP-Lösung und Fruktose

Kontrolltier:

Vitamintier:

0 Minuten:	130	E/1000
2 " :	98	"
4 " :	75	"
6 " :	74	"
8 " :	75	"
10 " :	78	"
15 " :	81	"

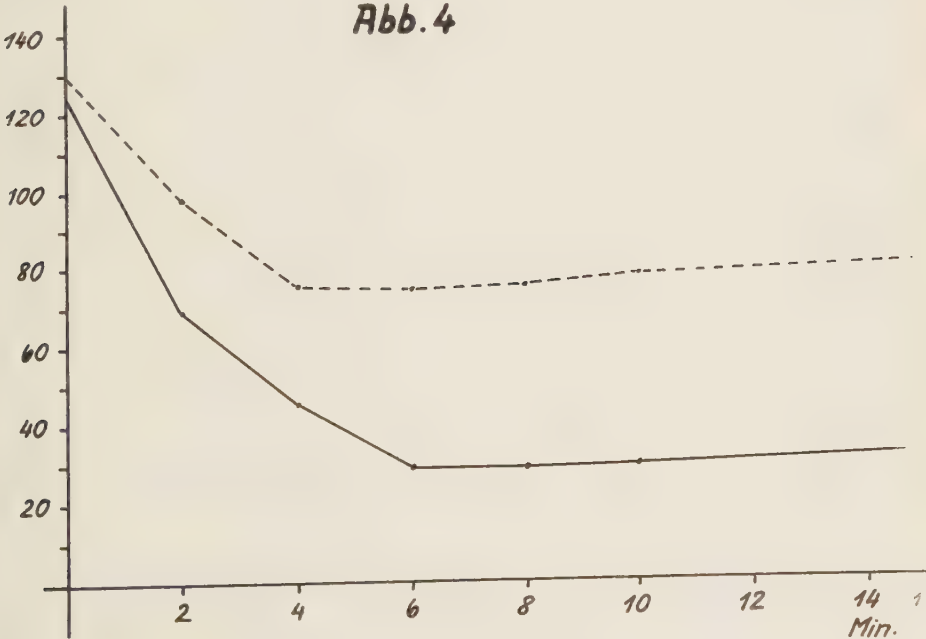
125	E/1000
68	"
45	"
28	"
28	"
29	"
32	"

Fermentsprung 10 E/1000

Fermentsprung 10 E/1000

E/1000

Abb. 4



Kontrolltier: - - - - -

Vitamintier: —————

Mit ATP-Lösung und Fruktose

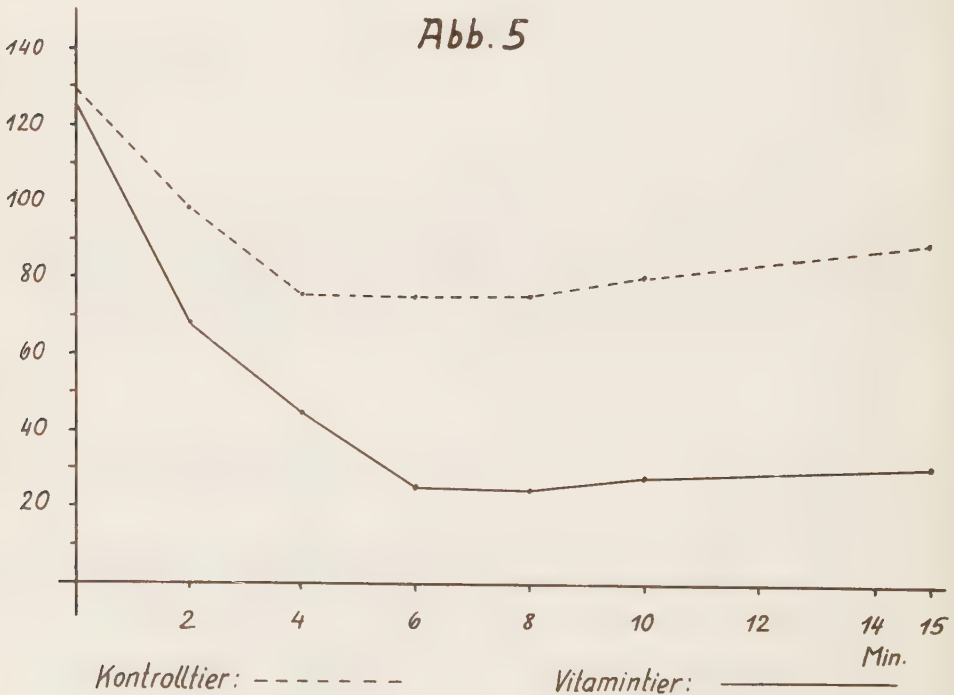
Kontrolltier:			Vitamintier:		
0 Minuten :	129	E/1000	125	E/1000	
2 " :	98	"	67	"	
4 " :	76	"	44	"	
6 " :	75	"	25	"	
8 " :	76	"	24	"	
10 " :	80	"	27	"	
15 " :	88	"	30	"	

Fermentsprung 10 E/1000

Fermentsprung 9 E/1000

E/1000

Abb. 5



Mit ATP-Lösung und Fruktose

Kontrolltier:

0 Minuten :	136 E/1000
2 " :	112 "
4 " :	88 "
6 " :	84 "
8 " :	85 "
10 " :	90 "
15 " :	95 "

Fermentsprung 8 E/1000

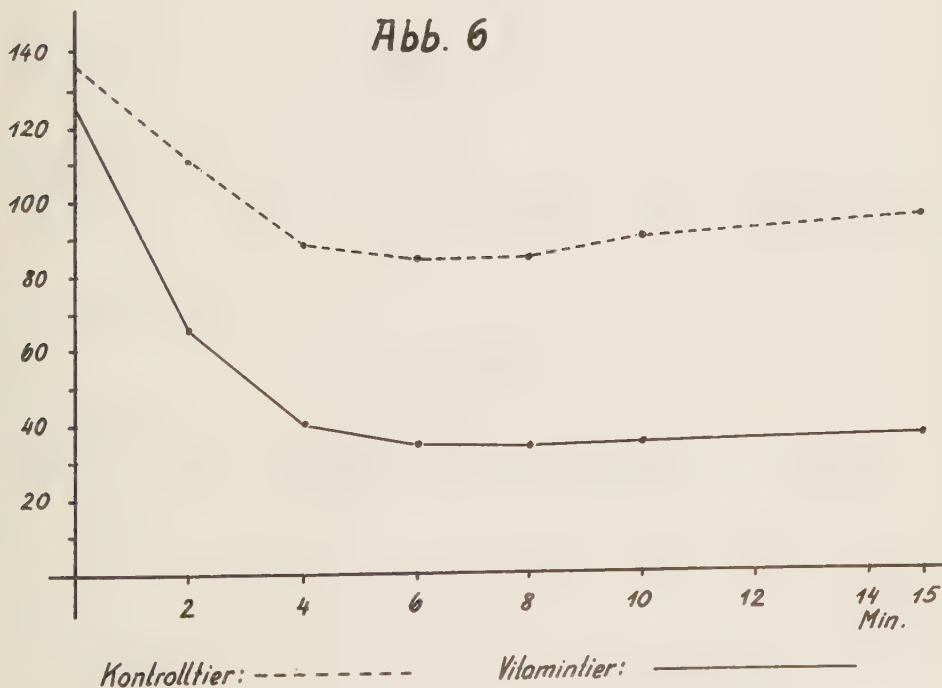
Vitamintier:

125 E/1000
65 "
40 "
34 "
33 "
34 "
36 "

Fermentsprung 10 E/1000

E/1000

Abb. 6



Besprechung der ersten Versuchsreihe

In der ersten Versuchsreihe wurden nun Fruktose und ATP mit Leberhomogenaten von Vitamin- und Kontrolltieren inkubiert. Die Ausgangskonzentrationen waren dabei größenordnungsmäßig gleich, jedoch bei Vitamintieren immer etwas weniger. Das läßt sich wahrscheinlich daraus erklären, daß die Aktivität des fruktoseverbrauchenden Mechanismus bei Vitamintieren derart gesteigert ist, daß die wenigen Sekunden bis zur Enteiweißung des Homogenats ausreichen, um die ATP-Konzentration herabzusetzen. Dies steigert sich in den folgenden Versuchsabschnitten derart, daß bereits nach 5 Minuten ein Maximum in der Konzentrationsdifferenz von ATP in den beiden Versuchen erreicht wird.

Der ATP-Abfall bei Vitamintieren ist doppelt so groß wie bei den Kontrolltieren vom Nullpunkt an gerechnet. Dabei erreicht die ATP-Konzentration bei Kontrolltieren früher (nach ca. 4 Minuten) ihr Minimum als bei Vitamintieren (nach ca. 6 Minuten).

Im weiteren zeigen die Kurven, daß nun der ATP-Gehalt wieder ansteigt, und zwar jener der Kontrolltiere mehr, als der der Vitamintiere.

Die folgende Versuchsreihe soll den ATP-Verbrauch von Vitamintieren und Kontrolltieren zeigen (bzw. deren Leberhomogenate), wenn anstelle der Fruktose in der gleichen Menge Aqua bidestillata zugegeben wird.

2. Versuchsreihe

Bei diesen Versuchen wurde an Stelle der Fruktose in der gleichen Menge Aqua bidestillata zur üblichen Versuchsanordnung zugegeben.

Mit ATP-Lösung, ohne Fruktose

Kontrolltier

Vitamintier

0 Minuten :	130 E/1000
2 " :	100 "
4 " :	85 "
6 " :	90 "
8 " :	95 "
10 " :	100 "
15 " :	105 "

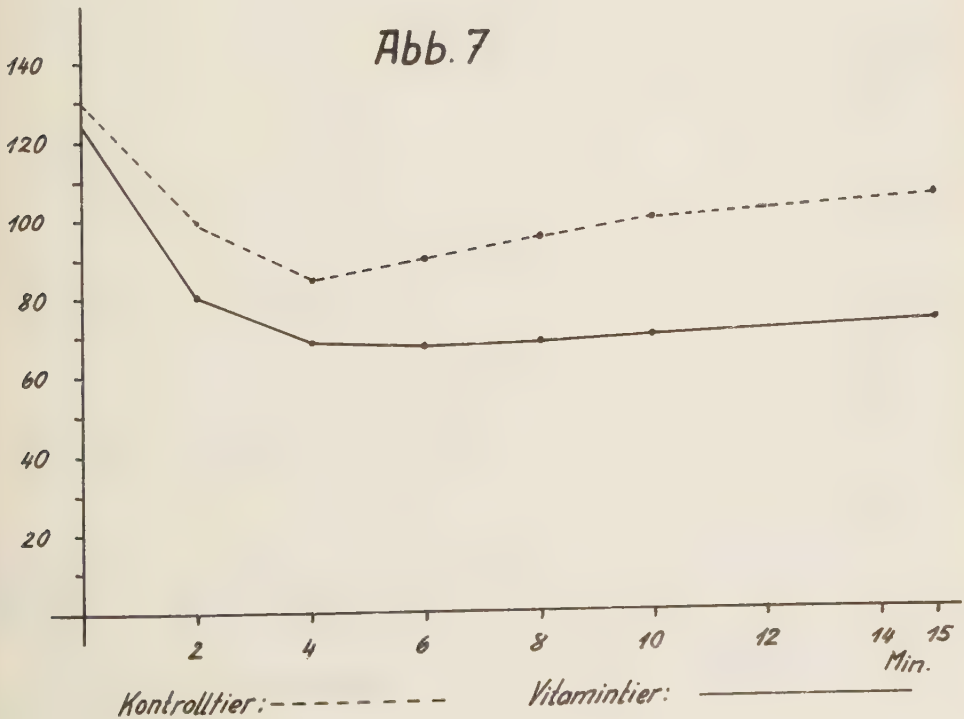
125 E/1000
80 "
68 "
67 "
68 "
70 "
73 "

Fermentsprung 9 E/1000

Fermentsprung 10 E/1000

E/1000

Abb. 7

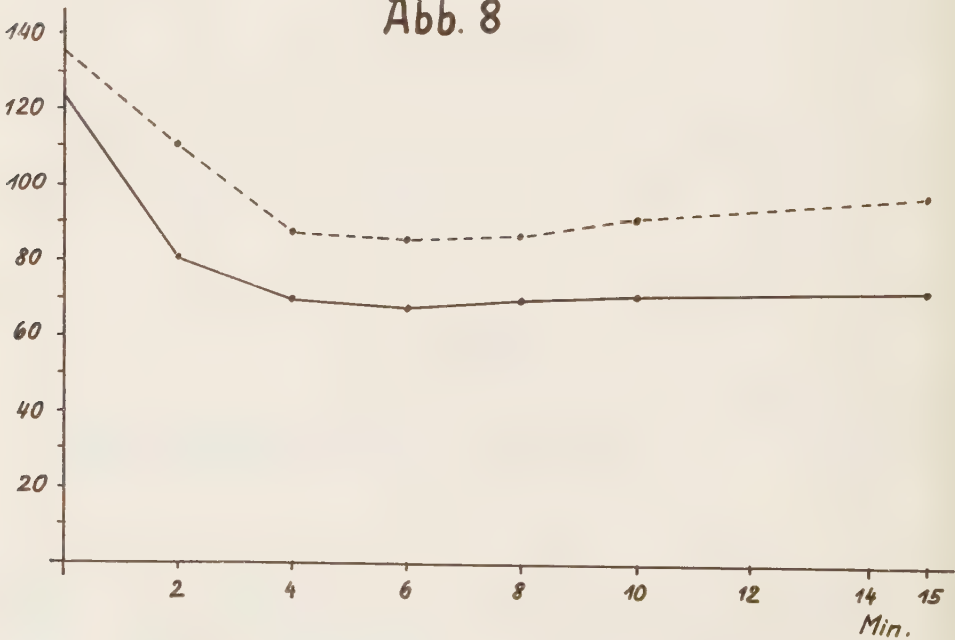


Mit ATP-Lösung, ohne Fruktose

Kontrolltier		Vitamintier	
0 Minuten :	135 E/1000	123 E/1000	
2 " :	110 "	80 "	
4 " :	87 "	69 "	
6 " :	85 "	67 "	
8 " :	86 "	69 "	
10 " :	91 "	70 "	
15 " :	96 "	72 "	
Fermentsprung 9 E/1000		Fermentsprung 8 E/1000	

E/1000

Abb. 8



Kontrolltier: - - - - -

Vitamintier: —————

Besprechung der zweiten Versuchsreihe

Wenn anstelle von Fruktose Aqua bidest. zugegeben wurde, so sollte damit dem fruktoseverbrauchenden Mechanismus das Substrat entzogen werden. Dabei zeigte sich, daß bei Kontrolltieren die ATP-Konzentrationskurve einen geringeren Abfall aufweist als beim Vollversuch, und zwar um ca. 20 E/1000.

Die Kurve der Vitamintiere hingegen liegt bedeutend höher als beim Vollversuch. Die Differenz beträgt im Durchschnitt 40 E/1000. Die Differenz zwischen Vitamin- und Kontrolltieren hat sich von 45 E/1000 auf 20 E/1000 verringert. Auch ist das Minimum bei beiden gleich schnell erreicht und zwar nach 4 Minuten. Da trotz Fruktosemangels in beiden Versuchsreihen ATP verbraucht wird, müssen noch andere ATP-verbrauchende Substanzen vorhanden sein. Das ist, da ja Leberhomogenat verwendet wurde, durchaus denkbar, z. B. andere in geringer Menge vorhandene Zucker u. a. Aber besonders der im zweiten Versuch viel geringere ATP-Verbrauch der Vitaminhomogenate, kann als Ausdruck der hier nicht vorhandenen Fruktose betrachtet werden.

3. Versuchsreihe

Hier wurde an Stelle der ATP-Lösung Aqua bidest. zugegeben.

Ohne ATP-Lösung, mit Fruktose

Kontrolltier

0 Minuten :	27	E/1000
2 " :	31	"
4 " :	32	"
6 " :	32	"
8 " :	33	"
10 " :	33	"
15 " :	32	"

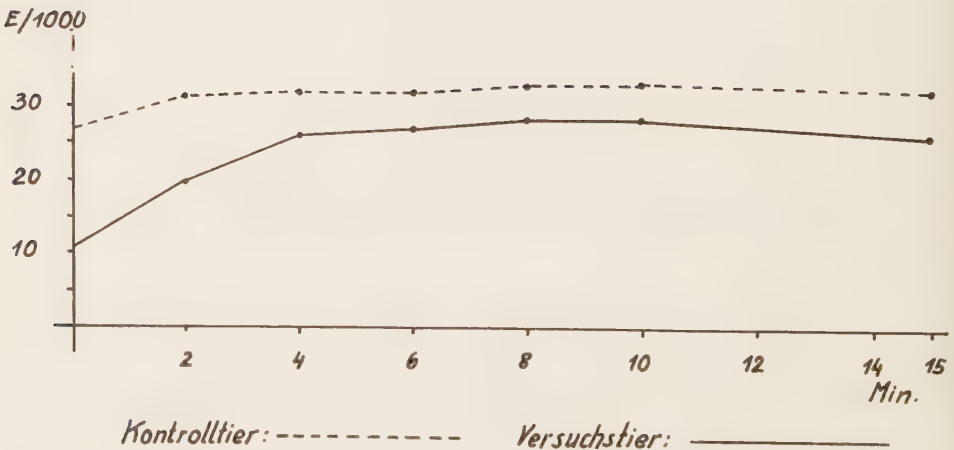
Vitamintier

11	E/1000
20	"
26	"
27	"
28	"
28	"
26	"

Fermentsprung 9 E/1000

Fermentsprung 10 E/1000

Abb. 9



Ohne ATP-Lösung, mit Fruktose

Kontrolltier

0 Minuten :	30 E/1000
2 " :	33 "
4 " :	35 "
6 " :	35 "
8 " :	36 "
10 " :	35 "
15 " :	34 "

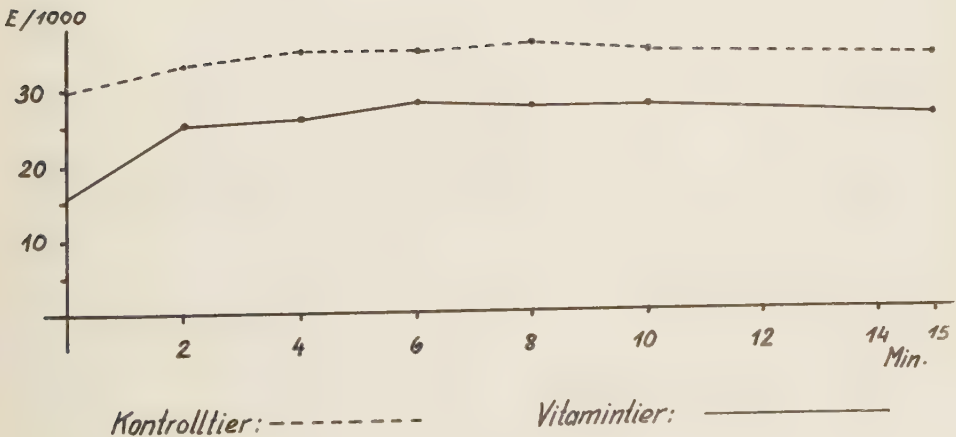
Fermentsprung 10 E/1000

Vitamintier

16 E/1000
25 "
26 "
28 "
27 "
27 "
26 "

Fermentsprung 12 E/1000

Abb. 10



Besprechung der dritten Versuchsreihe

In der dritten Versuchsreihe wurde anstelle der ATP-Lösung Aqua bidest. zugegeben. Die Homogenate der Kontrolltiere zeigen dabei einen ziemlich konstanten ATP-Gehalt, der in den ersten vier Minuten gering zum Maximum ansteigt und sich dann konstant verhält. Die Homogenate der Vitamintiere haben einen geringeren Gehalt an ATP, der bis ca. 6 Minuten stärker zunimmt und dann ebenfalls konstant weiter verläuft, sogar leicht absinkt.

Der niedrigere Ausgangspunkt ist möglicherweise verursacht durch den starken ATP-Verbrauch des durch Vitamin B₁₂ aktivierten Abbaus der Fruktose. Die Zunahme erklärt sich aus der Neubildung des Phosphats, die immer bei der Glykolyse erfolgt. Die Differenzen der Kurven sind von geringerem Interesse, da sie ja vom Ausgangszustand der einzelnen Tiere abhängig sind und stark variieren können.

4. Versuchsreihe

Hier wurde sowohl ATP als auch Fruktose durch Aqua bidest. ersetzt (Leerversuch).

Ohne ATP und ohne Fruktose

Kontrolltier

0 Minuten :	13 E/1000
2 " :	22 "
4 " :	27 "
6 " :	28 "
8 " :	29 "
10 " :	29 "
15 " :	30 "

Fermentsprung 9 E/1000

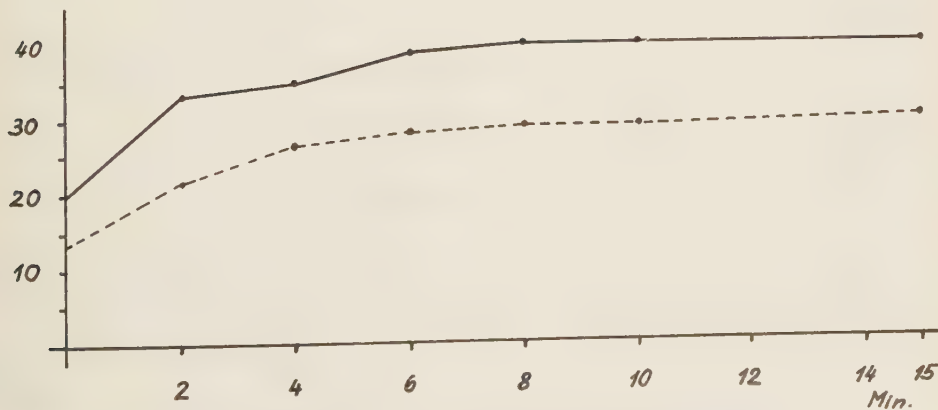
Vitamtintier

20 E/1000
33 "
35 "
38 "
40 "
40 "
40 "

Fermentsprung 8 E/1000

Abb. 11

E/1000



Kontrolltier: - - - - -

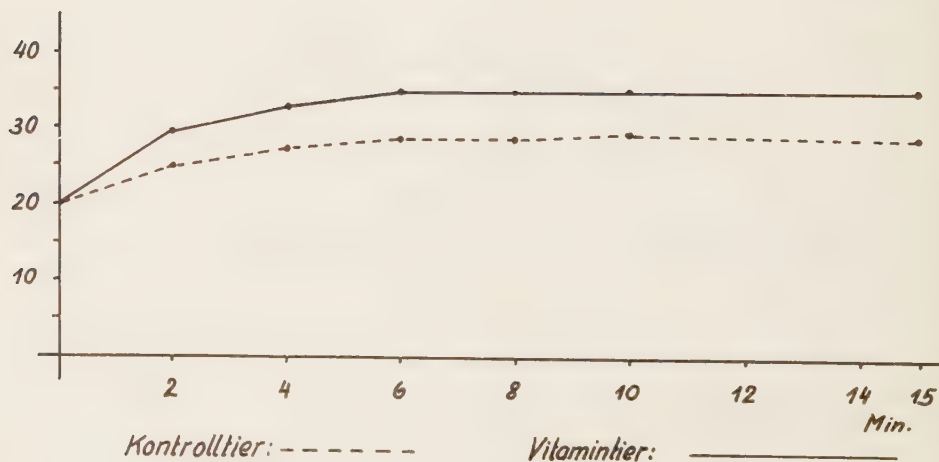
Vitamtintier: —————

Ohne ATP-Lösung und ohne Fruktose

Kontrolltier		Vitaminier	
0 Minuten :	20 E/1000	20 E/1000	
2 " :	25 "	29 "	
4 " :	27 "	33 "	
6 " :	28 "	35 "	
8 " :	28 "	35 "	
10 " :	29 "	35 "	
15 " :	28 "	35 "	
Fermentsprung 7 E/1000		Fermentsprung 10 E/1000	

Abb. 12

E/1000



Besprechung der vierten Versuchsreihe

Die vierte Versuchsreihe stellt den Leerversuch dar. Dabei wurde sowohl ATP als auch Fruktose durch Aqua bidest. ersetzt. Die Versuche zeigen also das an, was die einzelnen Leberhomogenate ürimär an ATP enthalten, und durch Stoffwechselvorgänge aus darin enthaltenen Substanzen bilden. Die Konzentrationskurven zeigen ein ähnliches Verhalten wie in der dritten Versuchsreihe, nur liegen die Kurven der Vitamintiere anscheinend etwas höher als die der Kontrolltiere. Auch dieser Unterschied ist zu erklären, da ja kein Überangebot an Substrat vorliegt, aber doch durch gesteigerten Abbau endogener Substanzen ein höherer ATP-Gehalt resultiert.

Die folgende fünfte Versuchsreihe soll nun zeigen, wie sich die ATP-Konzentrationen über längere Zeit hinweg verhalten. Die Homogenate wurden dabei bis zu 2 Stunden als Vollversuch inkubiert.

5. Versuchsreihe

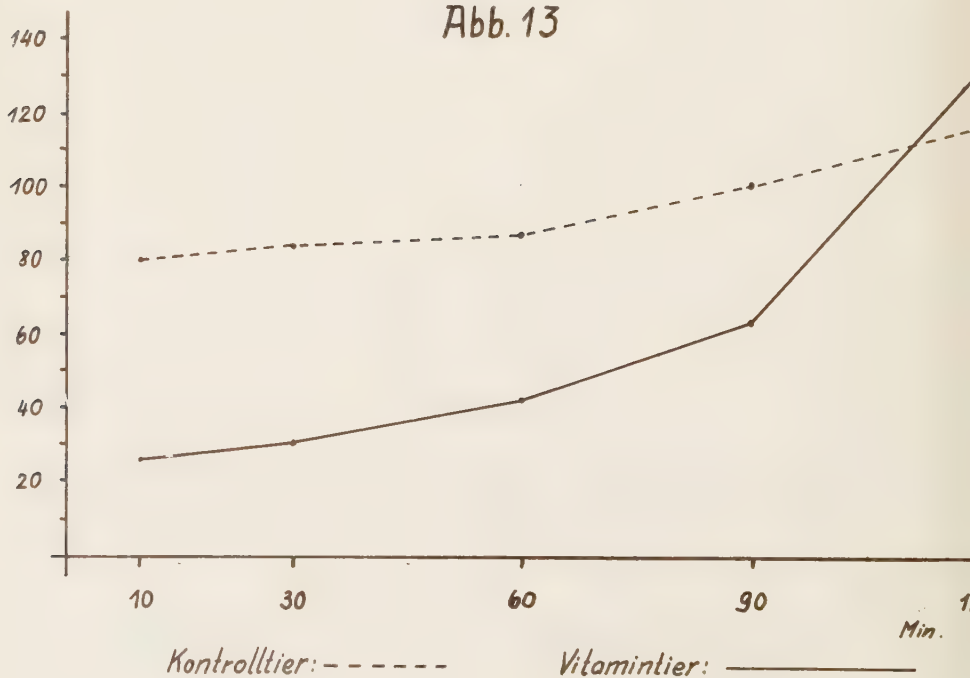
Hier wurde das Leberhomogenat mit ATP-Lösung und Fruktose bis zu 2 Stunden inkubiert, um den weiteren Verlauf der ATP-Konzentrationen zu erfassen.

Mit ATP-Lösung und Fruktose

Kontrolltier		Vitamintier	
10 Minuten :	80 E/1000	25 E/1000	
30 " :	83 "	30 "	
60 " :	86 "	41 "	
90 " :	100 "	62 "	
120 " :	115 "	130 "	
Fermentsprung 10 E/1000		Fermentsprung 10 E/1000	

E/1000

Abb. 13



Mit ATP-Lösung und Fruktose

Kontrolltier:

Vitamintier

10 Minuten :	78 E/1000
30 " :	82 "
60 " :	85 "
90 " :	100 "
120 " :	115 "

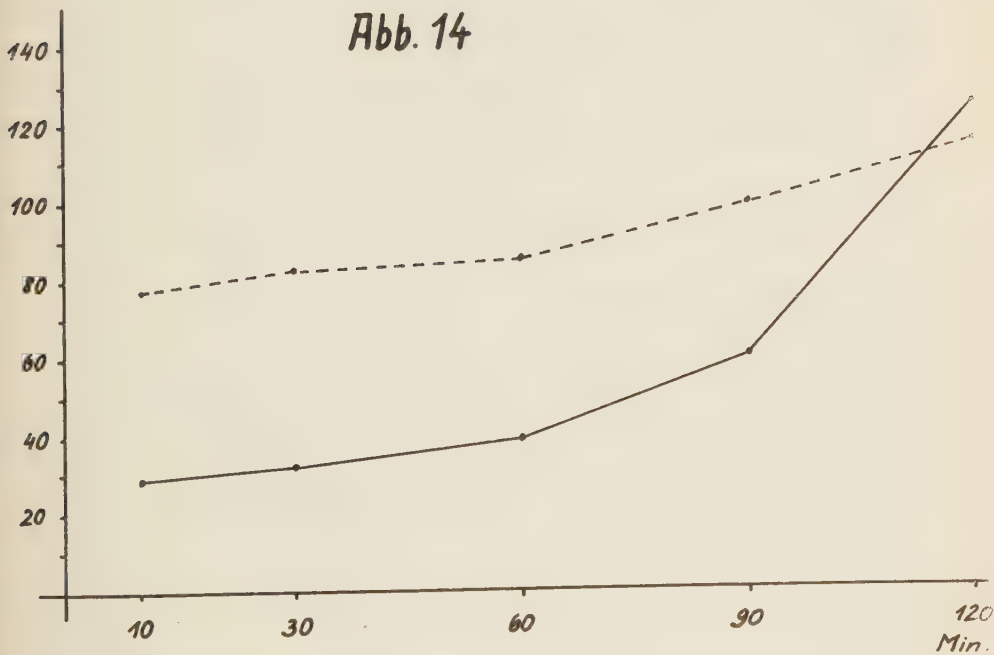
28 E/1000
31 "
39 "
60 "
125 "

Fermentsprung 10 E/1000

Fermentsprung 9 E/1000

E/1000

Abb. 14



Kontrolltier: - - - - -

Vitamintier: —————

Besprechung der fünften Versuchsreihe

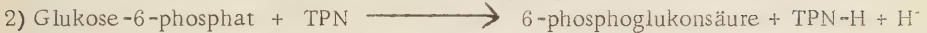
Diese Versuchsreihe hat folgendes gezeigt: Die Werte liegen nach 10 Minuten auf demselben Niveau, wie die der ersten Versuchsreihe, stellen somit eine Bestätigung dieser dar. Im weiteren Verlauf setzt sich der bereits früher beobachtete Kurvenanstieg fort.

Während die Kontrolltiere annähernd konstant die ATP-Konzentration steigern, beginnt bei den Vitamintieren nach ca. 60 Minuten ein immer steilerer Anstieg, der bei weitem die Konzentration der Kontrolltiere übersteigt.

Dieser steile Anstieg ist dadurch zu erklären, daß die Glykolyse der zugesetzten Fruktose soweit abgelaufen ist, daß sich ATP-Verbrauch und -Bildung nicht mehr die Waage halten, und die Neubildung bei weitem überwiegt.

Anhang

Der verwendete optische Test läuft nach der Formel ab:



Es wäre nun denkbar, daß noch Glukose-6-phosphat, das unter Umständen im Homogenat vorhanden ist, ebenfalls eine Erhöhung der TPN-H-Werte verursacht und damit die Extinktionswerte die Summe von ATP und Glukose-6-phosphat darstellen würden.

Um das eventuell vorhandene und damit die Reaktionsergebnisse beeinflussende Glukose-6-phosphat nachzuweisen, wurden folgende Überlegungen angestellt.

Zuerst wurde versucht, das Fermentgemisch, bestehend aus Zwischenferment und Hexokinase, das dem Testansatz als letztes zum Start zugegeben wird, getrennt voneinander zuzusetzen. Und zwar zuerst das Zwischenferment. Dann würde die Reaktion nach Formel 2) ablaufen. Die sich dabei ergebenden Extinktionswerte könnten dann von denen, nach Zugabe von Hexokinase abgezogen werden und ergäben dann die reinen ATP-Werte. Diese Möglichkeit wurde experimentell nicht verwirklicht, da das Zwischenferment immer geringe Mengen von Hexokinase enthält (LAMPRECHT) und dadurch, allein durch Zugabe des Zwischenferments auch Reaktion 1) in Gang käme.

Es besteht aber durch den Geschwindigkeitsunterschied zwischen Reaktion 1) und 2) doch eine Möglichkeit, beide Reaktionen getrennt zu erfassen.

Während der volle ATP-Test nach ca. 10 Minuten zum Stehen kommt, durchläuft das Glukose-6-phosphat innerhalb weniger Sekunden die Zwischenfermentreaktion. Der sogenannte Fermentsprung wird also nicht durch die Startfermente allein verursacht, sondern enthält ebenfalls das eventuell vorhandene Glukose-6-phosphat. Liest man nun diesen Fermentsprung ab und setzt, wenn der ATP-Test steht (nach ca. 10 Minuten), nochmals Fermentgemisch zu, so erhält man jetzt einen zweiten Fermentsprung, der aber nur durch die Fermente selbst verursacht wird. Die Differenz aus beiden Fermentsprüngen gibt dann den Wert des Glukose-6-phosphats an.

Folgende Werte wurden dabei erhalten (Vollversuch):

1. Fermentsprung

Fermentsprung nach 10 Min.

0 Minuten :	10 E/1000	10 E/1000
2 " :	10 "	9 "
4 " :	11 "	10 "
6 " :	10 "	10 "
8 " :	8 "	9 "
10 " :	11 "	10 "
15 " :	<u>12 "</u>	<u>10 "</u>
Durchschnitt	10,28 E/1000	9,71 E/1000

Die Durchschnittsdifferenz beträgt also 0,57 E/1000 bei einem willkürlich herausgegriffenen Versuchspaar. Daraus läßt sich schließen, daß nur geringste Mengen von Glukose-6-phosphat vorhanden sind und die in den Versuchsreihen gefundenen Werte von ATP keiner Änderung bedürfen.

Zusammenfassung

Wie VOGTMANN und ERNST zeigen konnten, ist Vitamin B₁₂ in der Lage, 2 Stunden vor Fruktoseinjektionen gespritzt, den erhöhten Blutzuckerspiegel rasch wieder zu senken.

Die eigenen Versuche sollten diese Beobachtungen von anderer Seite bestätigen, indem die ATP-Konzentrationen, die in Abhängigkeit zum Fruktoseabbau stehen, mit den gleichen Versuchsanordnungen beobachtet wurden. Das ATP verschwand in Leberhomogenaten von mit Vitamin B₁₂ vorbehandelten Tieren merklich schneller, als bei den Homogenaten von Kontrolltieren. Das ist im Hinblick auf das ebenfalls schnellere Verschwinden der Fruktose zu erwarten. Die einsetzende Neubildung von ATP im Homogenat ist die Folge der Neubildung dieser im glykolytischen Kohlehydratabbau. Auch in anderen Versuchen wurde nach Fruktosebelastung eine starke Erhöhung der ATP-Konzentrationen nachgewiesen (LAMPRECHT).

Es ist allerdings nicht möglich, aus den bis jetzt vorliegenden Versuchen eine Aussage über den Angriffspunkt des Vitamin B₁₂ im Fruktoseabbau zu machen. Ob Vitamin B₁₂ die Hexokinaseaktivität steigert, oder über den Aufbau anderer Fermentsysteme wirkt, oder die Verwertung einzelner Zwischenabbauprodukte steigert und damit ein stärkeres Gefälle im glykolytischen Geschehen hervorruft, bleibt weiteren Untersuchungen überlassen.

Herrn Dozent Dr. N. Zöllner spreche ich
für die Überlassung des Themas meinen ver-
bindlichsten Dank aus; desgleichen danke ich
Herrn Professor Dr. Stuhlfauth für seine
freundlichen Bemühungen.

Literaturverzeichnis

1. Chow, B.F. und
Chiun, T.L. J. Biol. Chem. 206, 797 (1954)
2. Lamprecht, W. Habilitations-Schrift
TH München (1957)
3. Stuhlfauth, K. Ärtzl. Forschung 5, 414 (1951)
4. Zöllner, N. und
Vogtmann, W. Klinische Wochenschrift
31./32. Heft, 761 (1952)

Lebenslauf

Ich, Roland Widmer, wurde am 10. November 1931 als Sohn des Polizeihauptmanns Otto Widmer und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Motz, in Stuttgart geboren.

Mit 6 Jahren trat ich in München in die Volksschule ein und nach 4 Schuljahren wurde ich in die Oberrealschule an der Frühlingstraße aufgenommen. Dort bestand ich im Juli 1951 das Abitur.

Anschließend studierte ich 3 Semester Maschinenbau an der Technischen Hochschule München, begann jedoch dann an der Universität München mein Medizinstudium.

Im Herbst 1956 machte ich das Physikum. Ein klinisches Semester studierte ich in Innsbruck, die anderen fünf in München. Im Dezember 1958 habe ich die Ärztliche Staatsprüfung bestanden und bin seitdem als Medizinalassistent tätig.

